DOI: 10.22055/IVJ.2023.376560.2531

بررسی انگل *بابزیا میکروتی* به روش PCR و تعیین توالی ژن 18S rDNA در کنه‌های سخت استان خوزستان

مریم محمودی‌پور[۱]، حسین حمیدی‌نجات[۲*] و محمدرضا تابنده[۳]

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۳] دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

دریافت: ۱۴۰۱/۹/۲۶ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۷

چکیده

بابزیوز یک بیماری قابل انتقال از کنه در حیوانات اهلی و وحشی در سراسر جهان است. این بیماری توسط گونه‌های مختلف *بابزیا* از جمله *بابزیا میکروتی* ایجاد می‌شود و از اهمیت زئونوتیک بین انسان و حیوان برخوردار است. اطلاعات محدودی در خصوص حضور *بابزیا میکروتی* در کنه‌های ایران در دسترس می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی حضور *بابزیا میکروتی* در کنه‌های سخت استان خوزستان و تعیین خصوصیات مولکولی و ژنوتیپی آن‌ها می‌باشد. بررسی حاضر یک نوع مطالعه میدانی- توصیفی- مقطعی می‌باشد که به مدت ۱۶ ماه از ابتدای خرداد ۱۳۹۷ تا پایان شهریور ۱۳۹۸ در استان خوزستان انجام گردید. در این مطالعه، جمع‌آوری کنه‌ها به طرق مختلف از سطح بدن دام‌های استان خوزستان (گاو، گوسفند، بز و اسب) به‌صورت تصادفی انجام گردید و در آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی با استفاده از کلیدهای تشخیصی معتبر، جنس و گونه کنه‌ها بررسی و تعیین شد. وجود عفونت *بابزیا میکروتی* و ژنوتیپ آن‌ها در کنه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از ژن 18S rDNA قطعه 149bp بررسی شد. در مجموع ۶۲۰ نمونه غدد بزاقی جمع‌آوری شده کنه‌ها شامل کنه‌های *رپیپی‌سفالوس تورانیکوس* (۱۵۰)، *رپیپی‌سفالوس سانگینئوس* (۶۰)، *هیالوما آناتولیکوم* (۳۱۰) و *هیالوما اکسکاواتوم* (۱۰۰) بودند. هر ۱۰ نمونه باهم ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه جهت استخراج DNA استفاده شدند. نتایج PCR نشان داد میزان آلودگی به *بابزیا میکروتی* در گونه *هیالوما آناتولیکوم* ۰/۶۴٪ می‌باشد. نتایج تعیین توالی ۴ نمونه PCR مثبت *بابزیا میکروتی* از ۴ منطقه استان خوزستان (اهواز، بهبهان، الهایی و لالی) نشان داد که در ایزوله اهواز، ۲ جهش در موقعیت ۴۶۵ (A>G) و ۵۱۷ (A>C) وجود دارد. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده‌ی وجود آلودگی *بابزیا میکروتی* در کنه‌های ایکسودیده دام‌های اهلی استان خوزستان بود و درنتیجه از نظر انتقال به انسان باید مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: فیلوژنی، *بابزیا میکروتی*، کنه‌ی سخت، 18S rDNA

مقدمه

بابزیا متعلق به شاخه‌ی آپی‌کمپلکسا، رده‌ی اسپوروزوا و زیررده‌ی پیروپلاسمیا می‌باشد که توسط انواع کنه‌ها منتقل می‌شود. کنه‌های ایکسودیده ناقل گونه‌های *بابزیا* هستند و در اروپا گونه‌های زئونوز *بابزیا* بیش‌تر توسط جنس *ایکسودس* منتقل می‌شوند (Kazimírová et al, 2016)، اگرچه این بیماری می‌تواند از طریق انتقال خون (Asante

*نویسنده مسئول : حسین حمیدی‌نجات، استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
E-mail: hamidinejat@scu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution- NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

et al, 2013) و انتقال از طریق مادر به جنین (Nzenze et al, 2013) نیز سرایت کند. انگل‌های *بابزیا* در یک سیستم پیچیده از ناقلان کنه و مخازن حیوانات نگهداری می‌شوند (Yabsley and Barbara 2013)، به طوری که کنه‌های نابالغ از پستانداران کوچک و متوسط و بعضی از گونه‌ها از پرندگان تغذیه می‌کنند (Hornok et al, 2014). کنه‌های بالغ معمولاً پستانداران با اندازه‌ی متوسط و بزرگ و نشخوارکنندگان بزرگ اهلی و وحشی (مانند گاو و گوزن) را آلوده می‌کنند (Silaghi et al, 2012). چرخه زندگی کامل برای درصد زیادی از گونه‌های *بابزیا* ناشناخته است، اما تاکنون کنه‌های خانواده‌ی ایکسودیده تنها ناقل بیولوژیک شناخته شده‌ی آن‌ها هستند (René et al, 2012).

ژنوتیپ‌های *بابزیا میکروتی* یک گروه متنوع از انگل‌های پراکنده در سراسر جهان و شامل دودمان‌های مختلف ژنومی گزارش شده‌ی تحت عنوان جدایه‌های ژنومی ایالات متحده، کوبه، هوبتسو، مونیخ، میمون/سنجاب، گوزن هستند. برخی از این گروه‌ها نیز تا کنون نامشخص مانده‌اند (Goethert and Telford 2003; Zamoto-Niikura et al, 2012).

مطالعات قبلی انجام شده در ایران وجود گونه‌های مختلف *بابزیا* را در کنه‌ها و میزبان‌های متفاوتی نشان داده است. در یک مطالعه، کنه‌های ایکسودیده‌ی گوسفند و بز وحشی در ایران، به‌منظور شناسایی کانون‌های عفونت‌های منتقله به انسان و حیوانات بررسی شده‌اند (Hoogstral and Wassef 1979). Rahbari نیز پراکندگی بوم‌شناختی گونه‌های مختلف کنه‌های حیوانات اهلی شمال غرب ایران را منتشر شناسایی و منتشر نموده است (Rahbari,1995). در مطالعه‌ای دیگر، فهرستی از گونه‌های کنه‌های حیوانات اهلی در شمال شرق کشور تهیه گردیده است (Razmi et al, 2002). این در حالی است که بر اساس بررسی‌های صورت گرفته در منابع منتشر شده، اطلاع دقیقی از حضور و اطلاعات مولکولی و ژنوتیپی *بابزیا میکروتی* در کنه‌های حیوانات اهلی ایران وجود ندارد.

عفونت‌زایی و بیماری‌زایی *بابزیا* بسته به گونه‌ی این تک‌یاخته واجد تفاوت‌های مشخصی است. عوامل مختلفی همچون افزایش تعامل بین افراد و محیط، سرکوب سیستم ایمنی، تغییرات آب و هوایی و تغییر در فراوانی گونه‌های کنه‌ی ناقل و ساختارهای جامعه می‌توانند در گسترش بیماری‌های منتقله از کنه در جمعیت‌های انسانی و حیوانی مؤثر باشند (Yabsley and Shock 2013). در حال حاضر، چند گونه از بابزیای مشترک بین انسان و دام در سراسر دنیا شناخته شده‌اند که در میان آن‌ها *بابزیا میکروتی*، به‌عنوان اصلی‌ترین عامل ایجادکننده‌ی موارد بابزیوز انسانی مطرح می‌باشد (Krause et al, 2019). بیش‌ترین موارد *بابزیا میکروتی* در انسان از ایالات مختلف آمریکا و اروپا گزارش شده است و این عفونت به‌عنوان یک معضل سلامتی در این مناطق محسوب می‌شود (Hildebrandt et al, 2007). بابزیوز انسانی به دلیل شیوع کم و یا مطالعات محدودتر، یک بیماری کمتر معرفی شده در آسیا است و وقوع آن در این بخش جهان به‌درستی مشخص نشده است (Tsuji et al, 2001). این بیماری با طیف گسترده‌ای از نشانه‌های بالینی، از عفونت بدون علامت در حدود یک چهارم بزرگسالان تا عفونت کشنده در ۲۱ درصد افراد دارای نقص سیستم ایمنی بروز می‌کند (Vannier and Krause 2012).

با در نظر گرفتن موارد فوق، بر اساس بررسی منابع منتشر شده تا کنون مطالعات مولکولی و ژنوتیپی برای تشخیص و شناسایی *بابزیا میکروتی* در کنه‌های ناقل ایران صورت نگرفته است، در نتیجه جهت شناسایی بابزیوز مشترک بین انسان و دام که به عنوان یک تهدید بهداشت عمومی در حال ظهور در آسیا (Hussain et al, 2021) مطرح و به عنوان یک بیماری مهم نوپدید مورد توجه قرار گرفته است، هدف از انجام این مطالعه بررسی حضور *بابزیا میکروتی* در کنه‌های سخت استان خوزستان و تعیین خصوصیات مولکولی و ژنوتیپی آن با استفاده از روش‌های مولکولی و تعیین توالی ژن 18S rDNA بوده است.

مواد و روش کار

طبق مطالعات سازمان هواشناسی ایران، استان خوزستان به دو منطقه‌ی آب و هوایی شامل منطقه‌ی کوهستانی در شمال و شرق استان و منطقه جلگه‌ای از جنوب تا کرانه‌های خلیج‌فارس و اروندرود تقسیم می‌شود. با توجه به این که استان خوزستان دارای آب و هوای مختلف نیمه‌بیابانی و نیز آب و هوای استپی گرم است، لذا این بررسی در نقاطی از استان، شامل شمال (اندیمشک، دزفول، لالی)، جنوب شرقی (بهبهان و امیدیه) شرق (ایذه، باغملک، رامهرمز، هفتگل و دهدز) شمال شرقی (اندیکا) غرب (الباجی، شوش، هویزه، سوسنگرد و حمیدیه) و مرکز (اهواز و شوشتر) انجام شد (Figure 1).

این بررسی یک مطالعه‌ی میدانی توصیفی – مقطعی بوده است که به‌مدت ۱۶ ماه از ابتدای خرداد ۱۳۹۷ تا پایان شهریور ۱۳۹۸ بر تعداد ۶۲۰ کنه از ۴ گونه‌ی *ریپی‌سفالوس تورانیکوس*، *هیالوما آناتولیکوم*، *هیالوما اکسکاواتوم* و *ریپی‌سفالوس سانگینئوس* جداشده از سطح بدن اسب، گاو، گوسفند و بز از گله‌های روستایی، اصطبل‌ها، میدان دام‌ها، کشتارگاه‌ها و درمانگاه‌ها صورت گرفت. نمونه‌ها درون ظروف نمونه‌برداری حاوی الکل ۷۰ درصد قرار داده شد و با درج مشخصات کامل آن‌ها (تاریخ نمونه‌برداری، نوع حیوان ، منطقه نمونه‌برداری و ...) به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز ارسال شدند. پس از تعیین هویت کنه‌ها با استفاده از استریومیکروسکوپ، عکس‌برداری و کلیدهای تشخیص معتبر، پراکندگی آن‌ها در مناطق مختلف محاسبه گردید (Estrada-pena, 2004).

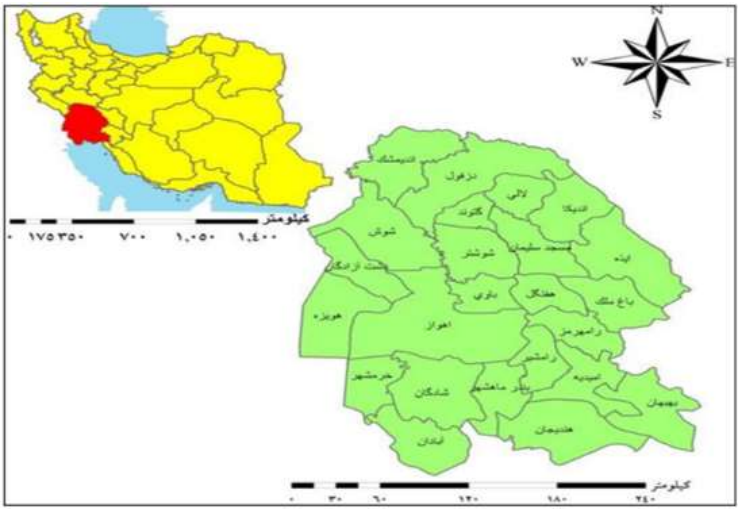

Figure 1: Geographic location of study zone (source: Firouzi et al. 2018)

جداسازی غدد بزاقی کنه‌ها بر اساس روش (Brown and Askenase, 1986) انجام گردید. غدد بزاقی جداشده به فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد جهت انجام کارهای مولکولی منتقل گردیدند.

استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری استخراج (شرکت رها زیست پادتن، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای استخراج DNA هر ۱۰ نمونه از غدد بزاقی از یک گونه‌ی مشخص تمام کنه‌های جدا شده باهم ترکیب شدند و به‌عنوان یک نمونه جهت استخراج DNA استفاده گردیدند. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد و نیز ارزیابی نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ با استفاده از میکرواسپکتروفوتومتر (اپندورف، آلمان) مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله اول PCR برای تعیین جنس *بابزیا* از پرایمر عمومی ژن 18S rDNA با توالی 389-401 bp استفاده شد (Persing et al, 1992) (Table 1).

Table 1: Nucleotide sequence and characteristics of primers used in this study

Target gene	PCR product size (bp)	Sequence	Accession NO	References
18s rDNA	389-401bp	Forward: 5'-CTTAGTATAAGCTTTTATACAGC-3' Reverse: 5'-TGTATCATTCAAGTTTCTGACCTAT-3'	MK609547.1	(Persing et al. 1992)
18s rDNA	149bp	Forward: 5´-GTTTATTTGATGTTCGTTT-3' Reverse: 5'-ATTAGCGAATCGCATGGCTT- 3'		current study

به‌منظور طراحی پرایمر جهت تشخیص *بابزیا میکروتی*، با توجه به اختلاف ژنوتیپی بالای توالی‌های 18S rDNA *بابزیا میکروتی* گزارش شده در بانک ژن NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide) و عدم وجود اطلاعات ژنوتیپی انگل در ایران، توالی‌های ژن 18S rDNA گزارش شده از مناطق مختلف جهان استحصال و با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 آنالیز همپوشانی انجام پذیرفت و ناحیه‌ی واجد بیش‌ترین تنوع ژنوتیپی به‌طول تقریبی 149bp جهت آنالیزهای بعدی انتخاب شد. سپس جهت تشخیص گونه‌ی *بابزیا میکروتی* از پرایمر 18s rDNA با توالی 149bp استفاده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در (Table 1) گزارش شده است. پرایمرهای مورد استفاده توسط شرکت پیشگام زیست‌فناوری سنتز گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

مخلوط واکنش PCR برای تشخیص جنس و گونه‌ی *بابزیا* در حجم 25µL حاوی 12.5 µL مسترمیکس آماده PCR (آمپلیمون، دانمارک)، پرایمرهای رفت و برگشت از هرکدام 1 µL با غلظت 10 mmol/L و از DNA 3µL (۲۰۰ نانوگرم) و آب مقطر 7.5 µL آماده شد. همچنین واکنش PCR طبق توضیحات (Table 1) انجام گردید. به‌منظور ارزیابی محصولات PCR از ژل آگاروز 1.5 درصد حاوی رنگ بی‌خطر (سیناژن، ایران) در بافر TAE استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ و به‌مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از دستگاه الکتروفورز ژل افقی (پایاپژوهش پارس، ایران) انجام شد. بررسی محصولات الکتروفورز با استفاده از دستگاه ژل‌داک (مبنا تجهیز، ایران) انجام گردید. در مجموع ۴ نمونه مثبت برای تعیین توالی به شرکت (پیشگام زیست‌فناوری، ایران) جهت خوانش دوطرفه ارسال گردید.

توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار chromas استخراج و با استفاده از ابزار ClustalW در نرم‌افزار MEGA7 هم‌تراز شدند. توالی‌های هم‌تراز شده به‌منظور ارزیابی میزان قرابت با توالی‌های موجود در بانک ژن با استفاده از ابزار nBLAST بانک ژن (NCBI https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) مورد بررسی قرار گرفتند. سپس توالی‌های به‌دست آمده‌ی دارای قرابت با توالی‌های موجود از بانک ژن استخراج و هم‌ترازی با استفاده از ابزار ClustalW در نرم‌افزار MEGA7 انجام شد. درخت فیلوژنیک با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 بر پایه‌ی روش Neighborhood joining با در نظر گرفتن پایداری توپولوژیک با ۱۰۰۰ تکثیر بوت استرپ[1] ارزیابی شد. به‌منظور تعیین فاصله‌ی ژنتیکی توالی‌های به‌دست آمده در این مطالعه با توالی‌های استحصال شده از بانک ژن از نرم‌افزار MEGA7 و روش فاصله جفت شده pairwise distance استفاده گردید.

1- Bootstrap

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن کدکننده 18S rDNA تشخیص آلودگی بابزیایی کنه‌های جمع‌آوری شده، نتیجه‌ی واکنش PCR در ۲۰ نمونه مثبت شد. نمونه‌های مثبت در کنه‌های *ریپی‌سفالوس تورانیکوس* در گوسفند (۲) و *هیالوما آناتولیکوم* در گاو (۵)، *هیالوما آناتولیکوم* در گوسفند (۵)، *هیالوما آناتولیکوم* در اسب (۲) و *هیالوما اکسکاواتوم* در گاو (۴) *هیالوما اکسکاواتوم* در گوسفند (۲) بودند. نتیجه‌ی واکنش روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد به‌شکل باند (389-401bp) مشاهده شد (Figure 2). پرایمرهای طراحی شده برای ژن 18S rDNA *بابزیا میکروتی* در کنه‌های جمع‌آوری شده در PCR مشخص کنندی ۴ نمونه-ی مثبت *بابزیا میکروتی* بود. همه‌ی این ۴ نمونه‌ی تشخیص داده شده از کنه‌ی *هیالوما آناتولیکوم* بودند. پس از الکتروفورز، نتیجه‌ی واکنش PCR موارد مثبت به‌شکل باند 149bp بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد مشاهده گردید (Figure 3).

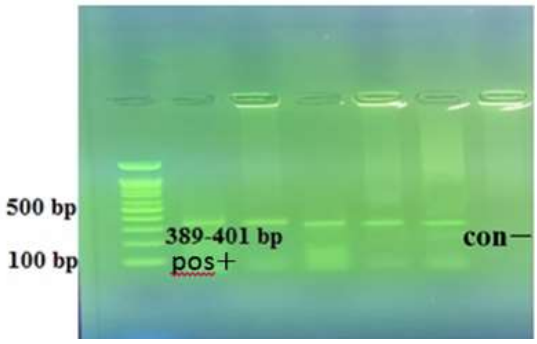

Figure 2 Agarose gel electrophoresis image related to 18S rDNA gene amplification with universal primer and production of 389-401 bp fragment.

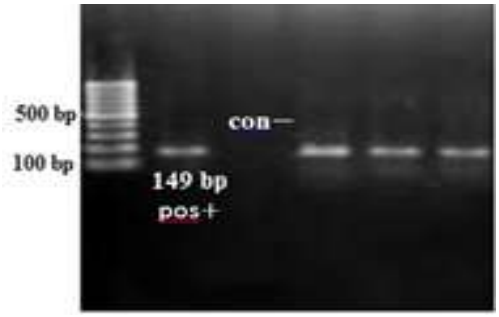

Figure 3: Agarose gel electrophoresis related to the amplification of 18S rDNA gene with *Babesia microti* specific primer and the production of 149 bp fragment.

نتیجه‌ی تعیین توالی ژن 18S rDNA

در مطالعه حاضر نشان داده شد که در ۴ مورد، (*هیالوما آناتولیکوم* در گاو (۳) *هیالوما آناتولیکوم* در گوسفند (۱)) کنه‌های مورد آزمایش به *بابزیا میکروتی* آلوده بودند. همچنین هم‌ردیف سازی توالی نوکلئوتیدی ژن اخیر 18S rDNA نشان داد که توالی‌های گونه‌ی *بابزیا میکروتی* جدا شده از کنه‌های *هیالوما آناتولیکوم* جمع‌آوری شده از گاو و گوسفند در بهبهان، الهایی و لالی دارای شباهت ۱۰۰ درصدی با یک‌دیگر بودند و تنها توالی اهواز دارای دو جهش A>G و A>C در موقعیت‌های 465 و 517 بود (Figure 4). در مجموع، توالی‌های به‌دست آمده از *بابزیا میکروتی* استان خوزستان با یک‌دیگر بیش از ۹۹/۹ درصد شباهت داشتند. این تک‌یاخته‌های مشخص شده از استان خوزستان با گونه‌ی *بابزیا میکروتی* جدا شده از کنه‌ی *ایکسودس ریسینوس* و دیگر کنه‌ها در کشورهای ایتالیا (KT318132.1)، آفریقا (U09833.1)، آمریکا (AY693840.1)، سنگاپور (MK609547.1)، ژاپن (LC005771.1) و چین (KF410826.1) دارای شباهت بیش از ۹۹ درصد بودند، اما با ایزوله‌ی چین با شماره دسترسی (MH208610.1) دارای فاصله ژنتیکی بسیار بالا در حدود 0.020 و 0.019 و شباهت ۸۹ درصدی بودند (Table 2).

Table 2: Percentage of similarity among *Babesia microti* 18S rDNA sequences, analyzed using a genetic distance model

1. Ahvaz_Kuzestan_Iran																		
2. Lali_Kuzestan_Iran	0.002																	
3. Elhayi_Kuzestan_Iran	0.002	0.000																
4. Behbahan_Kuzestan_Iran	0.002	0.000	0.000															
5. MK609547.1_BAB18001_Singapore	0.002	0.000	0.000	0.000														
6. AY693840.1_Gray_Isolate_USA	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000													
7. KT318132.1_Italy	0.005	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002												
8. AF231348.1_StrainGI_Germany	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002											
9. LC005771.1_IsolateBmSSR2182_Japan	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000										
10. MT423326.1_Isolate18MY2_China	0.014	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.014	0.012	0.012									
11. AB032434.1_StrainKobe524_Japan	0.014	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.014	0.012	0.012	0.000								
12. AB050732.1_StrainHobetsu_Japan	0.010	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.010	0.008	0.008	0.015	0.015							
13. AB243677.1_Isolate_AsRK/HM109_Jap	0.010	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.010	0.008	0.008	0.015	0.015	0.000						
14. KF410826.1_Isolate_TC2012B99_China	0.005	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.002	0.002	0.009	0.009	0.008	0.008					
15. MH208610.1_IsolateT102_China	0.020	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.020	0.017	0.017	0.019	0.019	0.018	0.018	0.020				
16. AY789075.1_Poland	0.017	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.017	0.015	0.015	0.014	0.014	0.019	0.019	0.013	0.018			
17. EF413181.1_Isolate_Jena/Germany	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.001	0.001	0.013	0.013	0.007	0.007	0.003	0.016	0.016		
18. AF231349.1_Strain_Berlin	0.005	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.002	0.002	0.012	0.012	0.006	0.006	0.002	0.017	0.015	0.001	
19. U09833.1_Sout_africa	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.012	0.012	0.008	0.008	0.002	0.017	0.015	0.001	0.002

Figure 4: Alignment of the 149 bp sequence of *Babesia microti* isolated from ticks of Khuzestan province using ClustalW software. Identical nucleotides are shown in the blue and different nucleotides are shown in colorless. The Singapore isolate (MK609547.1) and the U.S. Gray isolate (AY693840.1) was used as standard isolates.

نتایج درخت فیلوژنی

آنالیز درخت فیلوژنی حاصل از توالی ژن 18S rDNA انگل *بابزیا میکروتی* جدا شده در مطالعه‌ی حاضر و توالی‌های موجود در بانک ژن، نشان‌دهنده‌ی ۵ شاخه‌ی مجزا بود (Figure 5).

شاخه‌ی یک شامل جدایه‌های استان خوزستان به‌همراه دیگر جدایه‌های *بابزیا میکروتی* از سایر کشورها شامل ایتالیا (KT318132.1)، آفریقا (U09833.1)، آلمان (AF231348.1)، آمریکا (AY693840.1)، سنگاپور (MK609547.1)، ژاپن (LC005771.1)، چین (KF410826.1) بود. جدایه‌ی اهواز به‌علت جهش در طول ژن 18S rDNA در موقعیت A>G (465) و در موقعیت A>C (517) دارای اختلاف بالاتری نسبت به بقیه جدایه‌ها در همین شاخه بود (Figure 4). شاخه‌ی دو شامل جدایه-هایی از کشور آلمان، یعنی جدایه‌های (EF413181.1Jena, Berlin AF231349.1) دارای فاصله‌ی ژنتیکی (0.001-0.003)، شاخه‌ی سه شامل جدایه‌های ژاپن (AB050732.1 و AB243677.1) با فاصله‌ی ژنتیکی (0.010-0.015)، شاخه‌ی چهار شامل ایزوله‌های لهستان (AY789075.1)، چین (MT423326.1) و ژاپن (AB032434.1) با فاصله‌ی ژنتیکی نسبتاً بالا حدود (0.012-0.019) و شاخه‌ی پنج شامل جدایه‌ی چین (MH208610.1) دارای بیش‌ترین فاصله‌ی ژنتیکی با سایر جدایه‌های سراسر جهان (0.020-0.018) بود (Table 2).

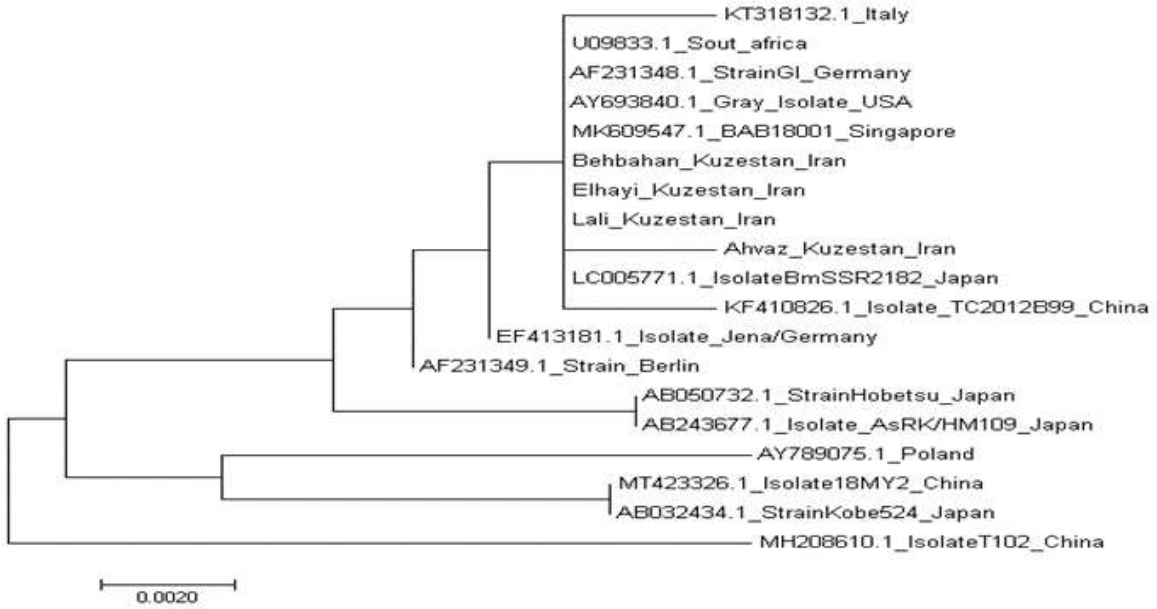

Figure 5: Phylogenic tree drawn using Neighbor_Joining method based on 18S rDNA sequence of *Babesia Microti* **collected from ticks of Khuzestan province and those collected from other countries.**

بحث

با توجه به گسترش و فراوانی بیماری‌های مشترک بین انسان و دام و اهمیت ویژه‌ی ناقلین این بیماری‌ها از نظر بهداشت و سلامت در ایران، تا کنون فقط دو مورد مطالعه پیرامون انگل *بابزیا میکروتی* در جوندگان وجود دارد. اولین‌بار در سال ۱۹۹۷ Mohebali و Kanani Notash با روش انگل‌شناسی در جوندگان شهرستان مشکین‌شهر اردبیل و سپس در سال ۲۰۱۳ Fallah و همکاران با بررسی انگل‌شناسی و مولکولی *بابزیا میکروتی* در جوندگان سراب آذربایجان شرقی، این موارد را گزارش نمودند که احتمالاً به‌دلیل شیوع کم این تک‌یاخته است و تا کنون مطالعه‌ای در خصوص انتقال *بابزیا میکروتی* از طریق کنه‌های سخت در ایران گزارش نگردیده است. در مطالعه حاضر، بررسی و شناسایی *بابزیا میکروتی* در کنه‌های سخت جمع‌آوری شده از دام‌های اهلی (اسب، گاو، گوسفند و بز) استان خوزستان صورت گرفت که نشان‌گر قابلیت احتمالی انتقال از طریق کنه‌ها را در ایران برجسته می‌کند. این کنه‌ها در هنگام جابه‌جایی همراه با حیوانات، خود نیز جابه‌جا می‌شوند و می‌توانند پاتوژن‌های متفاوت را انتقال دهند. در واقع، کنه ها ممکن است به‌عنوان نشان‌گرهای اپیدمیولوژیک توزیع عوامل عفونی مختلف مانند *ارلیشیا*، *ریکتزیا*، *بورلیا* و بابزیاها در نظر گرفته شوند. کنه‌های ایکسودیده، به‌خصوص انواع ۲ و ۳ میزبانه، ممکن است برای وعده‌های خون‌خواری، وابسته به مخازنی مانند برخی حیوانات حیات وحش باشند و بدین‌طریق آلودگی را به حیوانات اهلی نیز منتقل نمایند (Paddock and Yabsley, 2007). در بسیاری از مناطق مورد بررسی در این تحقیق، جمعیت‌های دام اهلی فاصله‌ی زیادی با این انواع حیات وحش ندارند. پدیده‌ی خاص کوچ عشایر نیز یکی دیگر از عوامل بسیار مهمی است که می‌تواند اینگونه آلودگی‌ها را در مناطق استان خوزستان وارد نماید. این مطالعه، بر اساس تشخیص مولکولی، میزان آلودگی به گونه *بابزیا میکروتی* را در کنه‌های *هیالوما آناتولیکوم* استان خوزستان در ۴ نمونه مشخص نمود که با گزارش‌هایی از کنه‌ی *ایکسودس ریسینوس* و دیگر کنه‌ها در کشورهای هلند (۰/۶ درصد – ۲/۳ درصد) (Wielinga et al, 2008)، جنوب آلمان (۱ درصد) (Hartelt et al, 2004)، سوئیس (۰/۷ درصد–۱/۷ درصد) (Casati et al, 2006) و بلاروس (۰/۵ درصد) (Reye et al, 2013) مطابقت دارد. باید در نظر داشت که

جنس *ایکسودس* کنه‌ی مناطق غیر جنگلی و گرمی نظیر استان خوزستان نیست و به‌نظر می‌رسد در اینگونه مناطق، سایر کنه‌ها بتوانند آلودگی به *بابزیا میکروتی* را در خود حفظ و انتقال دهند. در مطالعه‌ی Hamšíková و همکاران که به‌منظور بررسی آلودگی کنه‌های *ایکسودس ریسینوس* و *هم‌افیزالیس کانسینا* جمع‌آوری شده از جوندگان و پرندگان در زیستگاه شهری و حومه‌ی شهر در اسلواکی انجام گرفت ۳۳ کنه (۱/۲ درصد) از نظر *بابزیا* مثبت گزارش شدند که به‌ترتیب فراوانی، شامل *بابزیا میکروتی*، *بابزیا ونتروم* و *بابزیا دایورجنس* بودند (Hamšíková et al. 2016).

در بلژیک، اولین شواهد مولکولی ژنوتیک *بابزیا میکروتی* را بر روی *ایکسودس ریسینوس* سگ و گربه بررسی و جهت تشخیص موارد مثبت از ژن 18S rDNA استفاده نمودند (Lempereur et al, 2011)؛ اما در بعضی کشورهای اروپای مرکزی و شرقی، درصد آلودگی به نسبت بسیار بالاتری گزارش شده است، به‌طوری که در فرانسه (۶/۲ درصد) (Cotté et al, 2010)، لهستان (۱۶/۳ درصد) (Skotarczak and Cichocka, 2001) و در اتریش تا ۵۱ درصد بوده است (Blaschitz et al, 2008). این تفاوت‌ها می‌تواند به‌دلیل عوامل محیطی کنترل کننده‌ی وفور کنه‌ها، نقش احتمالی ناقلین، تأثیرات تنوع میزبان‌ها بر شیوع کنه‌ها، توانایی آن‌ها در انتقال عوامل انگلی به عنوان مخازن فعال و یا روش‌های جمع‌آوری کنه‌ها و نمونه‌برداری باشد.

نتایج فیلوژنی مطالعه‌ی حاضر نشان داد که جدایه‌ی *بابزیا میکروتی* با استفاده از قطعه‌ی ژن 18S rDNA در کنه‌های *هیالوما آناتولیکوم* جمع‌آوری شده از گوسفند و گاو در استان خوزستان وجود دارد. این گزارش اولین مورد تعیین توالی ژن 18S rDNA *بابزیا میکروتی* در کنه‌های جمع‌آوری شده از نشخوارکنندگان اهلی در استان خوزستان است. توالی‌یابی ژن 18S rDNA جدایه‌های خوزستان تنها در جدایه‌ی اهواز، ۲ جهش در موقعیت ۴۶۵ و ۵۱۷ را نشان داد که به‌ترتیب این تغییرات نوکلئوتیدی دارای جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی A>G و A>C بودند.

تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنی حاصل از توالی ژن 18S rDNA *بابزیا میکروتی* با روش neighbor joining انجام گرفت که در این تقسیم‌بندی جدایه‌های گونه‌های مختلف میزبان و مناطق، مختلف بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که *بابزیا میکروتی* جدا شده از کنه‌های *هیالوما آناتولیکوم* جمع‌آوری شده از گاو و گوسفند در استان خوزستان بالاترین تشابه را با *بابزیا میکروتی* جدا شده از کنه‌های *ایکسودس ریسینوس* و دیگر کنه‌ها در ایتالیا (KT318132.1)، آفریقا (U09833.1)، آلمان (AF231348.1)، آمریکا (AY693840.1)، سنگاپور (MK609547.1)، ژاپن(LC005771.1) ، چین (KF410826.1) داشتند که همه در یک خوشه قرار گرفتند. توپولوژی درخت فیلوژنیک تمام ژنوتیپ‌های 18S rDNA نشان داد که خوشه‌های متمایز و متفاوتی شامل ژنوتیپ‌های بیش‌تری از کشورهای دیگر نسبت به خوشه‌ی خوزستان بودند، اما در حقیقت، آنالیزهای فیلوژنتیکی نشان‌دهنده‌ی فواصل ژنتیکی بین جدایه‌های خوزستان با دیگر ایزوله‌ها در کشورهای دیگر است، به‌طوریکه این نتایج با داده‌های منتشر شده در کشورهای مختلف از جمله سنگاپور (0.002)، آمریکا (0.002)، آلمان (0.005-0.002)، ژاپن (0.002) و غیره مطابقت دارد، ولی نسبت به چین (0.019-0.020) دارای بیش‌ترین فاصله ژنتیکی است. تجزیه و تحلیل فیلوژنیک 18S rDNA توزیع جدایه‌های بررسی ما را با جدایه‌های مختلف *بابزیا میکروتی* از کشورهای دیگر در کلادهای مختلف اما با فواصل ژنتیکی کم نشان داد. تجزیه و تحلیل این تحقیق، گروه‌بندی قابل توجهی را بین خوشه‌ها از مناطق جغرافیایی مختلف یا از هر گونه‌ی میزبان حیوانی مختلف شناسایی نکرد. توالی ژن 18S rDNA جدایه‌های مختلف *بابزیا میکروتی* خوشه‌بندی ایزوله‌های تولید شده از یک میزبان خاص را نشان نداد. این احتمال می‌رود که تشخیص DNA *بابزیا میکروتی* در کنه‌های استان خوزستان خطر عفونت برای انسان را داشته باشد، این سوأل که آیا *بابزیا میکروتی* در ایران قابلیت یک زئونوز را دارد یا خیر را نمی‌توان به‌شکل قطعی پاسخ داد و این

مسئله نیاز به تحقیقات تکمیلی دارد. با توجه به این که با تشخیص و شناسایی DNA *بابزیا میکروتی* در کنه‌ها و جوندگان در بسیاری از کشورهای اروپایی، تنها یک مورد بابزیوز انسانی در یک فرد محلی گزارش گردیده است و با ذکر این نکته که اولین مورد بابزیوز انسانی ناشی از *بابزیا میکروتی* در اروپا توسط گونه‌ای ایجاد شد که ۱۰۰ درصد شباهت با سویه‌ی خاکستری زئونوز با شماره دسترسی (AY693840) را دارد، این احتمال به‌صورت قوی‌تری مطرح می‌گردد که *بابزیا میکروتی* خوزستان امکان بیماری‌زایی مشترک بین انسان و دام را دارا است.

به‌طور کلی، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که کنه‌های خانواده‌ی ایکسودیده ممکن است نسبت به آنچه در گذشته گزارش شده است، نقش مهم‌تری در انتقال عوامل بیماری-هایی نظیر بابزیوز به انسان را داشته باشند. با توجه به افزایش روزافزون جمعیت کنه‌ها و افزایش مقاومت آن‌ها نسبت به سموم، تغییرات جوی نظیر گرم‌تر شدن دنیا و نقل و انتقال‌های مختلف جمعیتی انسان و حیوانات، بررسی ژنومی آلودگی به عوامل بیماری‌زای مشترک بین انسان و دام توسط کنه‌ها در مناطق مختلف کشور توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز، ابراز می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع مالی

هزینه پایان‌نامه مزبور، در قالب پژوهانه، از دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شده است.

منابع

Asante, E. A., Linehan, J. M., Smidak, M., Tomlinson, A., Grimshaw, A., Jeelani, A., ... & Collinge, J. (2013). Inherited prion disease A117V is not simply a proteinopathy but produces prions transmissible to transgenic mice expressing homologous prion protein. *PLoS Pathogens*, *9*(9), e1003643.

Blaschitz, M., Narodoslavsky-Gföller, M., Kanzler, M., Stanek, G., & Walochnik, J. (2008). Babesia species occurring in Austrian Ixodes ricinus ticks. *Applied and environmental microbiology*, *74*(15), 4841-4846.

Brown, S. J., & Askenase, P. W. (1986). Amblyomma americanum: physiochemical isolation of a protein derived from the tick salivary gland that is capable of inducing immune resistance in guinea pigs. *Experimental parasitology*, *62*(1), 40-50.

Casati, S., Sager, H., Gern, L., & Piffaretti, J. C. (2006). Presence of potentially pathogenic Babesia sp. for human in Ixodes ricinus in Switzerland. *Annals of agricultural and environmental medicine*, *13*(1).

Cotté, V., Bonnet, S., Cote, M., & Vayssier-Taussat, M. (2010). Prevalence of five pathogenic agents in questing Ixodes ricinus ticks from western France. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *10*(8), 723-730.

Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J. L., & Walker, A. R. (2004). Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. *University of Zaragoza, Spain*, *131*.

Fallah, E., Aboalsoltani, N., Bazmani, A., Khanmohammadi, M., Hazratian, T., & Shahbazi, A. (2013). Parasitological and molecular investigation of Babesia microti in rodents of Sarab district of east Azerbaijan. *Journal of Comparative Pathobiology*, *10*(3), 1039-1044.

Goethert, H. K., & TELFORD, S. R. (2003). Enzootic transmission of Babesia divergens among cottontail rabbits on Nantucket Island, Massachusetts. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *69*(5), 455-460.

Hamšíková, Z., Kazimírová, M., Haruštiaková, D., Mahríková, L., Slovák, M., Berthová, L., ... & Schnittger, L. (2016). Babesia spp. in ticks and wildlife in different habitat types of Slovakia. *Parasites & Vectors*, *9*(1), 1-14.

Hartelt, K., Oehme, R., Frank, H., Brockmann, S. O., Hassler, D., & Kimmig, P. (2004). Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of Anaplasma phagocytophilum (Ehrlichia sp.), Wolbachia sp., Rickettsia sp., and Babesia sp. in Southern Germany. *International Journal of Medical Microbiology Supplements*, *293*, 86-92.

Hildebrandt, A., Hunfeld, K. P., Baier, M., Krumbholz, A., Sachse, S., Lorenzen, T., ... & Straube, E. (2007). First confirmed autochthonous case of human Babesia microti infection in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *26*(8), 595-601.

Hoogstraal, H., & Wassef, H. Y. (1979). Haemaphysalis (Allophysalis) Kopetdaghica: identity and discovery of each feeding stage on the wild goat in northern Iran (Ixodoidea: ixodidae). *The Journal of Parasitology*, 783-790.

Hornok, S., Kováts, D., Csörgő, T., Meli, M. L., Gönczi, E., Hadnagy, Z., ... & Hofmann-Lehmann, R. (2014). Birds as potential reservoirs of tick-borne pathogens: first evidence of bacteraemia with Rickettsia helvetica. *Parasites & vectors*, *7*(1), 1-7.

Hussain, S., Hussain, A., Aziz, M. U., Song, B., Zeb, J., George, D., & Sparagano, O. (2021). A Review of zoonotic babesiosis as an emerging public health threat in Asia. *Pathogens*, *11*(1), 23.

Kazimírová, M., Hamšíková, Z., Kocianová, E., Marini, G., Mojšová, M., Mahríková, L., ... & Rosá, R. (2016). Relative density of host-seeking ticks in different habitat types of south-western Slovakia. *Experimental and Applied Acarology*, *69*(2), 205-224.

Krause, P. J. (2019). Human babesiosis. *International journal for parasitology*, *49*(2), 165-174.

Lempereur, L., De Cat, A., Caron, Y., Madder, M., Claerebout, E., Saegerman, C., & Losson, B. (2011). First molecular evidence of potentially zoonotic Babesia microti and Babesia sp. EU1 in Ixodes ricinus ticks in Belgium. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *11*(2), 125-130.

Mohebali, M., & Kanani Notash, A. (1997). First report on the diagnosis of Babesia microti in rodents trapped in Meshkinshahr. Veterinary Researches & Biological Products, 10(2), 134-135.

Nzenze, S. A., Shiri, T., Nunes, M. C., Klugman, K. P., Kahn, K., Twine, R., ... & Madhi, S. A. (2013). Temporal changes in pneumococcal colonization in a rural African community with high HIV prevalence following routine infant pneumococcal immunization. *The Pediatric infectious disease journal*, *32*(11), 1270-1278.

Paddock, C. D., & Yabsley, M. J. (2007). Ecological havoc, the rise of white-tailed deer, and the emergence of Amblyomma americanum-associated zoonoses in the United States. Wildlife and emerging zoonotic diseases: the biology, circumstances and consequences of cross-species transmission, 289-324.

Rahbari, S. (1995). Studiesonso meecological aspectsof tick fauna of West Azarbayejan. *Iran. J. Appl. Anim. Res*, *7*, 189-194.

Razmi, G. R., Naghibi, A., Aslani, M. R., Fathivand, M., & Dastjerdi, K. (2002). An epidemiological study on ovine babesiosis in the Mashhad suburb area, province of Khorasan, Iran. *Veterinary Parasitology*, *108*(2), 109-115.

René, M., Chêne, J., Beaufils, J. P., Moro, C. V., Bourdoiseau, G., Mavingui, P., & Chabanne, L. (2012). First evidence and molecular characterization of Babesia vogeli in naturally infected dogs and Rhipicephalus sanguineus ticks in southern France. *Veterinary Parasitology*, *187*(3-4), 399-407.

Reye, A. L., Stegniy, V., Mishaeva, N. P., Velhin, S., Hübschen, J. M., Ignatyev, G., & Muller, C. P. (2013). Prevalence of tick-borne pathogens in Ixodes ricinus and Dermacentor reticulatus ticks from different geographical locations in Belarus. *PloS one*, *8*(1), e54476.

Silaghi, C., Woll, D., Hamel, D., Pfister, K., Mahling, M., & Pfeffer, M. (2012). Babesia spp. and Anaplasma phagocytophilum in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents–analyzing the host-pathogen-vector interface in a metropolitan area. *Parasites & Vectors*, *5*(1), 1-14.

Skotarczak, B., & Cichocka, A. (2001). Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of Babesia microti and Babesia divergens in ticks in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *8*(2).

Tsuji, M., Wei, Q., Zamoto, A., Morita, C., Arai, S., Shiota, T., ... & Ishihara, C. (2001). Human babesiosis in Japan: epizootiologic survey of rodent reservoir and isolation of new type of Babesia microti-like parasite. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(12), 4316-4322.

Vannier, E., & Krause, P. J. (2012). Human babesiosis. *New England Journal of Medicine*, *366*(25), 2397-2407.

Wielinga, P. R., Fonville, M., Sprong, H., Gaasenbeek, C., Borgsteede, F., & Giessen, J. W. V. D. (2009). Persistent detection of Babesia EU1 and Babesia microti in Ixodes ricinus in the Netherlands during a 5-year surveillance: 2003–2007. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *9*(1), 119-122.

Yabsley, M. J., & Shock, B. C. (2013). Natural history of zoonotic Babesia: role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *2*, 18-31.

Zamoto-Niikura, A., Tsuji, M., Qiang, W., Nakao, M., Hirata, H., & Ishihara, C. (2012). Detection of two zoonotic Babesia microti lineages, the Hobetsu and US lineages, in two sympatric tick species, Ixodes ovatus and Ixodes persulcatus, respectively, in Japan. *Applied and environmental microbiology*, *78*(9), 3424-3430.

Received: 17.12.2022
Accepted: 28.05.2023

Vol. 19, No. 4, Winter, 2024 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2023.376560.2531

Investigation of *Babesia microti* parasite by PCR method and determining the sequence of 18S rDNA gene in Ixodidae in Khuzestan province

Maryam Mahmoodipour[1], Hossein hamidinejat[2*] and mohammadreza tabandeh[3]

[1] PhD Student of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Professor, Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 17.12.2022 Accepted: 28.05.2023

Abstract

Babesiosis is a tick-borne disease in domestic and wild animals worldwide. This disease is caused by different species *Babesia*, including *Babesia microti*, which is zoonotic and can be transmit between humans and animals due to their ability to be transmitted from blood. Limited information is available regarding the presence of *Babesia microti* in ticks in Iran. The aim of this study was to investigate the presence of *Babesia microti* in ticks of Khuzestan province and to determine their molecular and genotypic characteristics. The present study was a field-descriptive-cross-sectional study that was conducted for 16 months from June 2017 to September 2018 in Khuzestan province. The ticks (No = 620) were collected from cows, sheep, goats and horses in Khuzestan province and their characteristics were determined using valid keys. The presence of *Babesia microti* infection and its genotype in collected ticks were investigated by polymerase chain reaction (PCR) using 18S rDNA gene, amplifying a PCR product of 149 bp in length. A total of 620 salivary gland samples collected from ticks included *Rhipicephalus turanicus* (150), *Rhipicephalus sanguinus* (60), *Hyalomma anatolicum* (310) and *Hyalomma exquavatum* (100). Ten samples were pooled as one sample for DNA extraction. The results of PCR showed that the infection rate of *Babesia microti* in *Hyalomma anatolicum* species is 64%. The results of the sequencing of 4 PCR positive samples of *Babesia microti* from 4 regions of Khuzestan province (Ahvaz, Behbahan, Elahaye and Lali) showed that there are 2 mutations at position (A>G) 465 and (A>C) 517 in Ahvaz isolate. The results of this study also showed the presence of *Babesia microti* infection in the ticks of domestic animals in Khuzestan province, which should be considered in terms of transmission to humans.

Key words: Phylogeny, *Babesia microti,* 18S rDNA, Ixodidae

[*] **Corresponding Author**: Hossein hamidinejat, Professor, Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: hamidinejat@scu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).